Saarbrücken 1969

*Jürgen Günter Harms*

# Probleme der Resistenzbildung bei der zytostatischen Behandlung von Karzinomen

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552706_0014

Aus der Universitäts-Frauenklinik des
Saarlandes, Homburg-Saar

Direktor: Prof. Dr. med. H. Limburg

---

# PROBLEME DER RESISTENZBILDUNG BEI DER ZYTOSTATISCHEN BEHANDLUNG VON KARZINOMEN

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1 9 6 9

vorgelegt von

Jürgen Günter Harms

geb. am 5. Februar 1944 in Darmstadt

Dekan: Prof. Dr. med. H. Witter

Referent: Prof. Dr. med. H. Limburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

# I N H A L T S V E R Z E I C H N I S


A. EINLEITUNG 1

I. Resistenzbildung als Problem der Chemotherapie 1

II. Resistenzbildung als Problem der Einzelzelle 4

III. Verfahren zur Resistenzprüfung 5

IV. Testsubstanzen und deren intrazelluläre Angriffspunkte 7

B. MATERIAL UND METHODE 9

I. Chemische Struktur des SP-I (Proresid) und seine Markierung mit Tritium zur autoradiographischen Anwendung 9

II. Methodik der Autoradiographie und Kriterien ihrer Anwendung 18

III. Präparation der Tumorgewebe 22

IV. Methodenkritik 26

C. ERGEBNISSE 29

D. DISKUSSION 43

E. ZUSAMMENFASSUNG 46

F. LITERATURVERZEICHNIS

## A. EINLEITUNG:

### I. Die Resistenzbildung als Problem der Chemotherapie:

Seit Einführung der Chemotherapie in die Behandlung von Rezidiven oder carcinomatösen Endstadien werden Beobachtungen berichtet, daß es gelungen ist, durch den Einsatz von einem oder mehreren Zytostatika das Geschwulstleiden über Monate, vereinzelt auch über Jahre einzudämmen. Für die Auswahl eines carcinostatischen Medikamentes bietet der histologische Befund keinen ausreichend sicheren Hinweis, da es sich bei einer großen Anzahl von Versuchen gezeigt hat, daß Tumoren mit gleicher histologischer Diagnose und identischer Wachstumsform ein individuelles und unterschiedliches Verhalten der einzelnen Tumorzellen aufweisen (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18).
Durch zytochemische Untersuchungen an der Einzelzelle konnten signifikante Unterschiede im Ablauf der Biosynthese von einzelnen Tumorzellen aus der gleichen Zellpopulation nachgewiesen werden. Diese zytochemische Heterogenität, die sich an dem DNA-, RNA- und Proteingehalt der Tumorzelle zeigen ließ, bildet

die Grundlage für das unterschiedliche Verhalten einer Zellpopulation auf eine zytostatische Substanz. Die Resistenzbildung in einer vom zytochemischen Gesichtspunkt aus heterogenen Carcinomzellen bestehenden Zellpopulation kann als "cloning effect" des Hemmstoffes aufgefaßt werden. Als Ergebnis dieses Selektionsmechanismus werden aus einer relativ kleinen Zahl resistenter Zellen neue Populationen mit den gleichen Resistenzeigenschaften heranwachsen.

Die Problematik der Resistenzbildung ist in ähnlicher Weise von der Antibiotika-Chemotherapie der bakteriellen Infektionskrankheiten bekannt. Es werden dort folgende Möglichkeiten (2, 27, 28, 29, 31) der Resistenzentwicklung diskutiert:

1. Mikroorganismen, die von ihrem Genom her in der Lage sind, resistent oder adaptiv werden zu können.
   a. Primär resistente Keime, d. h. solche Keime, die von vornherein durch ein bestimmtes Antibiotikum nicht beeinflußbar sind.
   b. Ausbildung sekundärer Resistenz, d. h. die Resistenz entsteht, wenn ein Keim mit einem Antibiotikum über eine ge-

wisse Zeit behandelt wurde.

Die Keime besitzen also die Fähigkeit, resistent zu werden, wenn auch verzögert und in Abhängigkeit des erst anlaufenden Vorganges der Adaption.

Diese kann folgendermaßen erklärt werden:

aa. Durch Überwindung der kompetitiven Hemmung, d. h. ein Wirkstoff, der mit einem essentiellen Metaboliten in Konkurrenz tritt, wird in seiner Wirkung abgeschwächt, indem der Metabolit in erhöhtem Maße synthetisiert wird.

bb. Wird durch ein Chemotherapeutikum ein Syntheseweg blockiert, so können hierzu fähige Organismen einen anderen Weg wählen, der zum gleichen Endprodukt führt, sog. "by-pass-reaction".

cc. Adaption infolge Enzyminduktion, d. h. ein Ferment, welches das Chemotherapeutikum in seiner Wirkung aufhebt, muß erst durch dieses als Effektor induziert werden.

2. Mikroorganismen, die von ihrem Genom her nicht in der Lage sind, resistent oder adaptiv werden zu können. Hier ist für die Resistenzentwicklung eine Veränderung des

Genoms nötig. Diese kann durch folgende Mechanismen geschehen:

a. Mutationen

b. Transfer-Vorgange, d. h. Übertragung genetischen Materiales, was eine Übertragung von DNA bedeutet. Dabei kommen folgende Möglichkeiten in Betracht:

   aa. Übertragung episomaler DNA

   bb. Transduktion und Transfektion

   cc. Transformation

II. Die Resistenz als Problem der Einzelzelle:

Neben den bisher aufgeklärten Mechanismen der Resistenzentstehung bei Tumoren, wie Selektion resistenter Mutationsformen, Resistenzwandel unter Zytostatikatherapie und Resistenz nach Ausfall eines Enzyms, das zur Umwandlung eines Zytostatikums in seine intrazelluläre Form benötigt wird, glaubt man aufgrund der o. a. Möglichkeiten auch an ähnliche Mechanismen einer Resistenzübertragung bei Tumorzellen.
Neben den Mechanismen der Resistenzbildung muß bei der Zytostatikawirkung auf maligne Tumoren auch mit Unterschieden in der Toxizität gerechnet werden, die auf molekularbiologische Vor-

gänge in der Einzelzelle zurückzuführen sind und sich in der unterschiedlichen Verteilung und Aufnahme der zytostatischen Substanz in die Zelle, sowie in deren unterschiedlichen Bindungsfähigkeit an die Zellmembran zeigen (17, 30).

Die Krebszelle stellt eine wachstumsfähige Umwandlungsform einer normalen Körperzelle dar, die gegen die Regulationsfaktoren des Organismus resistent geworden ist. Ihre Entstehung kann als Ausbildung einer Resistenzform angesehen werden, deren Resistenz sich gegen das natürliche Hemmsystem des Organismus richtet (11).

Das Ziel der Chemotherapie ist, Substanzen zu finden, die eine spezifische Hemmwirkung gegen Tumorzellen zeigen, während sie die normale Körperzelle unbeeinflußt lassen. Die Chemotherapie stellt sich also als ein qualitatives Problem der einzelnen Tumorzelle dar (3, 8, 11, 12, 13, 18, 30).

III. Verfahren zur Resistenzprüfung:

Auf der Suche nach einer Voraussage über die unterschiedliche Wirkung des gleichen zytostatischen Medikamentes auf histologisch und klinisch gleichartige Tumoren wurden durch

Anwendung von Gewebekulturverfahren in vitro Teste entwickelt, die es ermöglichen sollen, in jedem Einzelfalle am entnommenen Tumorgewebe die Sensibilität gegenüber einer Vielzahl von Zytostatika zu bestimmen (8, 14, 16). Dabei wird menschliches Tumorgewebe, welches frisch durch Operation oder Biopsie gewonnen wurde, zur Kultivierung trypsiniert, in der Gewebekultur gezüchtet und anschließend gegen ein Spektrum von Zytostatika ausgetestet. Erweist sich ein Zytostatikum im therapeutischen Bereich als vollständig unwirksam, so liegt eine primäre Resistenz der Tumorzelle gegenüber dem Medikament vor. Für die morphologisch beurteilbare Zytostatikumwirkung ist hierbei das Verhältnis der sensiblen zu den resistenten Zellen im gleichen Tumorgewebe wichtig (11, 13).

Von sekundärer Resistenz spricht man dann, wenn nach längerer Behandlung mit einem anfänglich wirksamen Medikament die resistenten Zellen selektioniert werden und zum Wachstum eines resistenten Tumors führen. Bei der großen Zahl von Mutationsformen maligner Zellen können durch somatische Mutationen auch neue Resistenzeigenschaften erworben werden.

Die Wirkung der getesteten zytostatischen Substanzen auf die Proliferationskinetik der Tumorzellen wird semiquantitativ ausgewertet.

IV. Testsubstanzen und deren intrazellulärer Angriffspunkt:

Folgende zytostatische Substanzen gelangen im Resistenztest zur Anwendung:

1. Alkylierende Substanzen:
   Endoxan (ASTA), Trenimon (BAYER), Thio-Tepa (LEDERLE)
2. Mitosegifte:
   Proresid (SANDOZ), VB 74 und VM 26 (SANDOZ)
3. Antimetabolite:
   Metotrexat (LEDERLE)
4. Hormone:
   Progesteron, Norgestrol (SCHERING), Ultracorten (CIBA)
5. Enzyme:
   L-Asparaginase

Der intrazelluläre Angriffspunkt der einzelnen Zytostatika ist folgender Tabelle zu entnehmen.

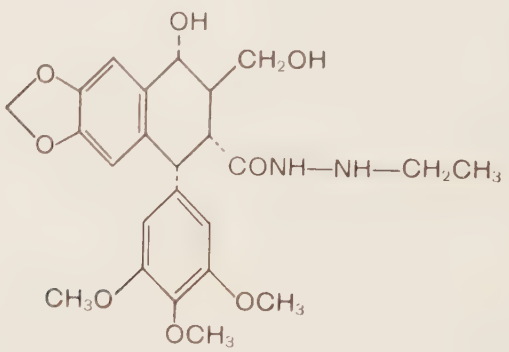
## Intrazelluläre Wirkung der Zytostatika:

| | | |
|---|---|---|
| I. | DNA-Hemmer: | |
| | Alkylierung | Stickstoff-Lost<br>Äthylenimin<br>Sulfonester |
| | Depolymerisation | Mitomycin C<br>Actinomycin D<br>5-Bromo-(iodo, chloro-)<br>desoxyuridin |
| II. | RNA-Hemmer: | |
| | Anormale Inkorporation | 5-Fluoro-uracil<br>5-Fluoro-2-desoxyuridin<br>8-Azaguanin |
| | Komplexbildung | Puromycin |
| III. | Purin- und Pyrimidin-Hemmer: | |
| | | Methotrexat<br>6-Mercapto-purin<br>Azaserin<br>DON (Diazo-5-oxo-h-norleucin)<br>Habacidin<br>6-Azauridin |
| IV. | Mitosehemmer: | |
| | | Colchicin<br>Podophyllotoxin<br>Vinblastin<br>Vincristin |
| V. | Glycolyse-Hemmer: | |
| | | Desoxyglucose<br>Desoxygalactose |
| VI. | Atmungshemmer: | |
| | | Methyl-glyoxal-bis-(guanylhydrazone)<br>Progesteron<br>Antimycin A<br>Oxygen |
| VII. | Verschiedene Mechanismen: | |
| | | Hormone: Prednisolone<br>Anti-HCG-Serum |
| VIII. | Enzymtherapie: | |
| | | L-Asparaginase (bei Asparagin-Synthetase-Defekt der Tumorzellen anwendbar) |

## B. MATERIAL UND METHODE:

### I. Chemische Struktur des SP-I (Proresid) und seine Markierung mit Tritium zur autoradiographischen Anwendung:

In der vorliegenden Arbeit wurde das Äthylhydrazid der Podophyllinsäure verwandt, das zwecks autoradiographischer Untersuchung an der 4-Methoxy-Gruppe mit Tritium markiert wurde.




Äthylhydrazid der Podophyllinsäure, SP-I

Zahlreiche Tierexperimente haben erwiesen, daß die halbsynthetischen Podophyllinderivate im Gegensatz zum Podophyllotoxin relativ schwach toxisch sind, was besonders in der geringen Hemmwirkung auf das hämatopoetische System zum Ausdruck kommt, während ihr antimitotischer

Effekt bei zahlreichen Arten maligner Tumoren stark ausgeprägt ist (5, 6, 24, 26). Sie stören den Aufbau der Mitosespindel und führen dadurch zu einer Arretierung des Mitoseablaufes in der Metaphase. Die Analyse in der Zellkultur hat gezeigt, daß fast alle in der Metaphase arretierten Zellen nach einiger Zeit unter Bildung von Kern- und Plasmatrümmern zugrunde gehen (6, 26).

Neben dieser rein antimitotischen Wirkung müssen aber auch zytotoxische Effekte auf die Interphasezellen angenommen werden, die sich kinematographisch in Granulabildung, Fältelung und Schrumpfung des Zytoplasmaleibes bis zum vollständigen Zerfall und nachfolgender Kernpyknose zeigten (9).

Auch elektronenmikroskopisch ließ sich eine hydropische Umwandlung des Nukleolus, eine Hypertrophie der Vakuolen und eine vakuolige Umwandlung der Zellen mit Mitochondrienzerfall als zytotoxischer Effekt nachweisen (26).

Am Beispiel des Einbaues von mit Tritium markierten Proresid (SANDOZ) soll in der folgenden Arbeit untersucht werden, ob bei sensiblen und resistenten Zellen aus dem gleichen Tumorgewebe ein unterschiedliches Verhalten bezüglich des Einbaues dieser Substanz besteht.

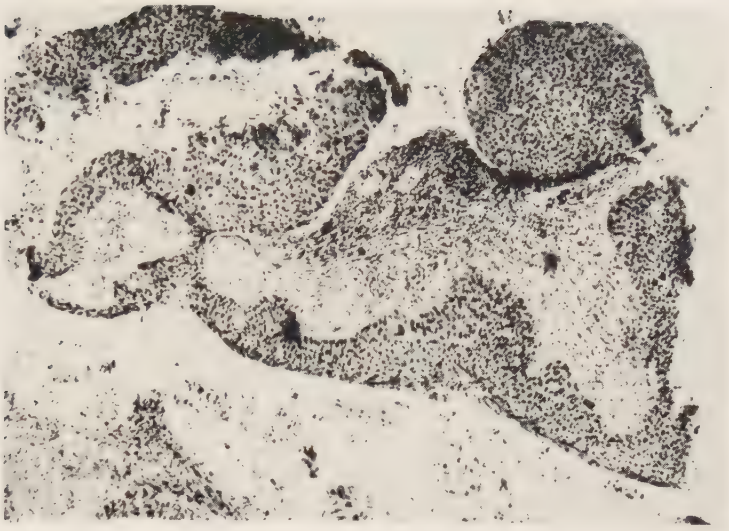
Aus dem Verhalten der Gesamtkultur und der einzelnen Tumorzelle sind Rückschlüsse auf die Resistenzlage des jeweiligen Tumors zu erwarten.

Da in sämtlichen Untersuchungen, nach übereinstimmender Auskunft mehrerer Autoren (8, 11, 14, 16, 17), ein individuelles Verhalten des jeweiligen Tumors unabhängig von der histologischen Struktur und dem Reifungsgrad zu beobachten war, soll die vorliegende Untersuchung prüfen, ob die Resistenz als Problem der Einzelzelle anzusehen ist.

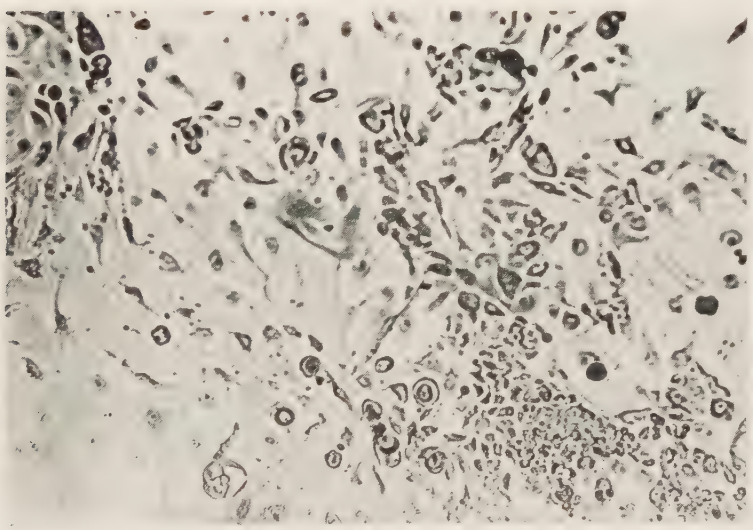
An sieben Tumoren des weiblichen Genitale wurde autoradiographisch der zelluläre Einbau des $H^3$-Äthylhydrazid der Podophyllinsäure im Vergleich zu morphologisch faßbaren Veränderungen ihrer Proliferationskinetik untersucht.

Dabei wurden verwandt:

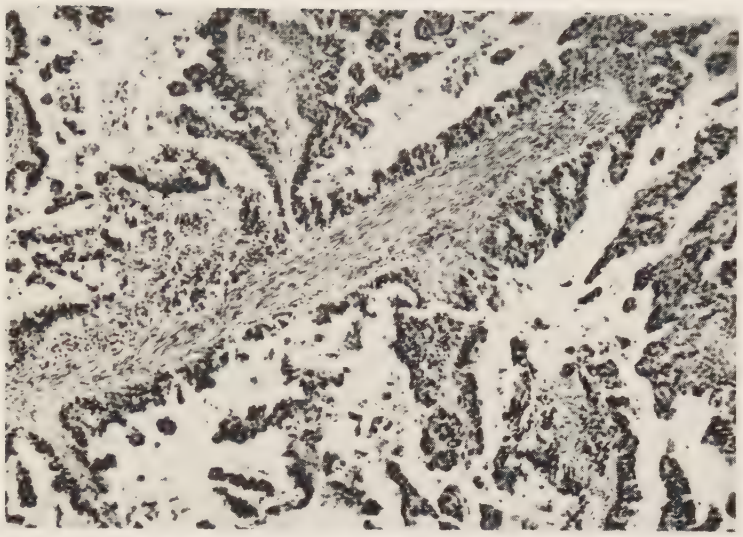
1. Ein Carcinom der Portio uteri
2. Ein Carcinom des Corpus uteri
3. Ein Carcinom der Vulva
4. Ein benignes Ovarialkystom
5. Ein maligner Granulosazelltumor
6. Zwei Ovarialcarcinome



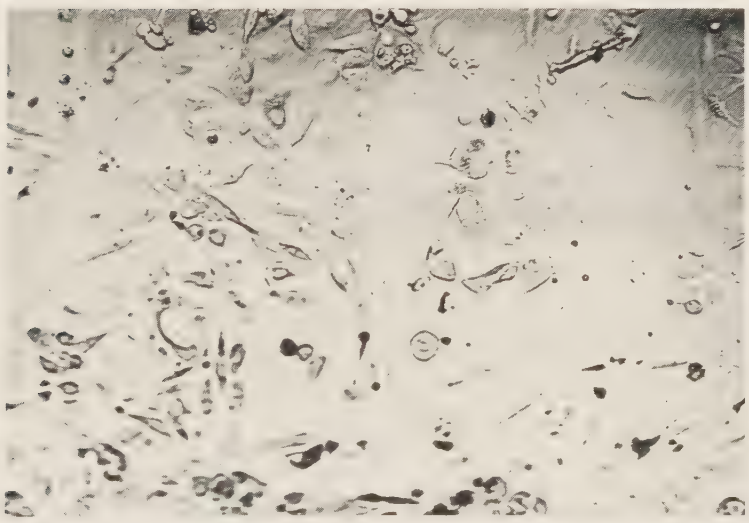
Ausschnittsvergrößerung eines unreifzelligen Carcinoma in situ der Portio, bei dem stellenweise Einwachsen in Drüsen beobachtet wurde.



Zellen des gleichen Carcinoms in der Zellkultur 4 Tage nach Explantation.

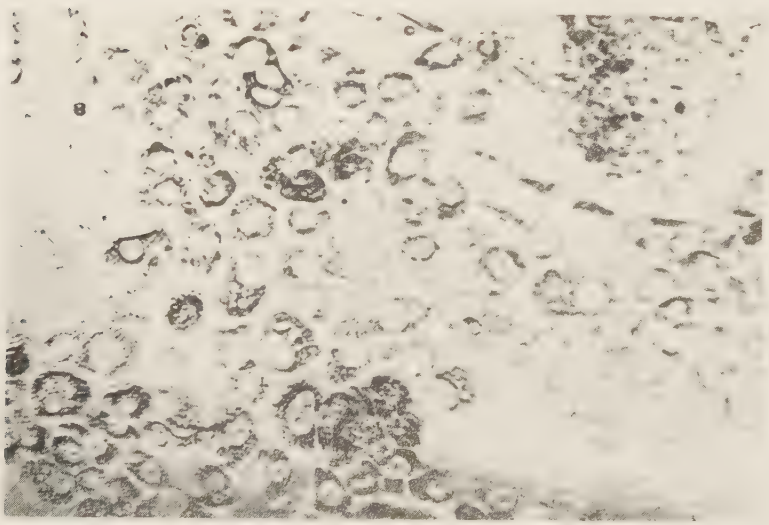


Ausschnittsvergrößerung eines Carcinoma adenomatosum et papillomatosum des Corpus uteri

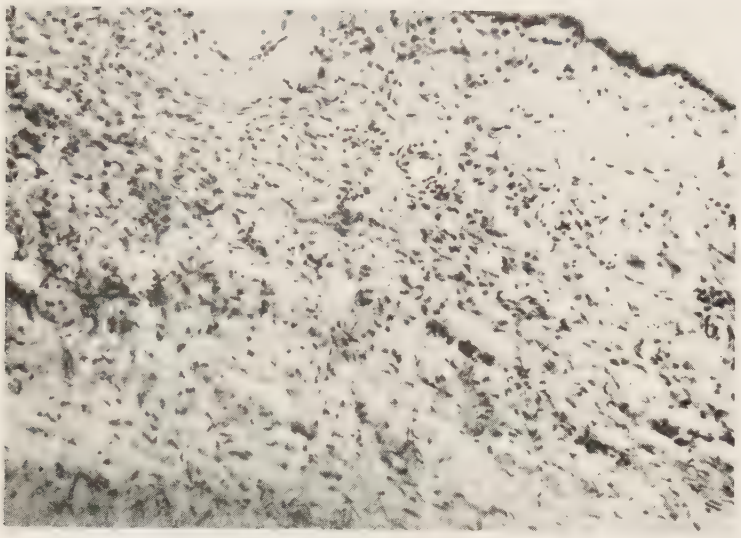


Zellen des gleichen Carcinoms in der Zellkultur 5 Tage nach Explantation

Ausschnittsvergrößerung eines Plattenepithel-Carcinoms der Vulva, invasiv wachsend mit Metastasen



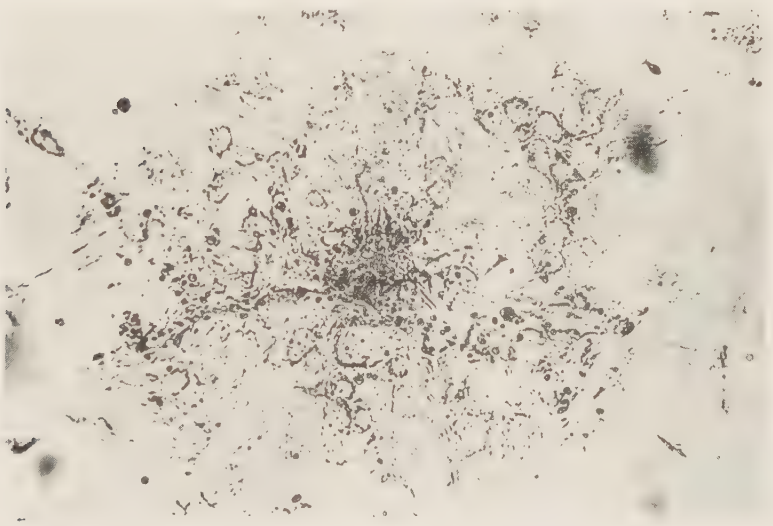
Zellen des gleichen Carcinoms in der Zellkultur 4 Tage nach Explantation



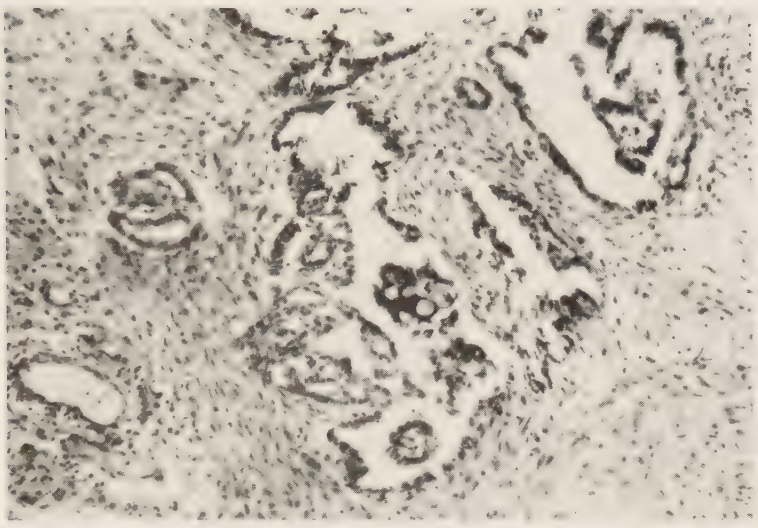
Ausschnittsvergrößerung eines Kystoma ovarii simplex

Zellen des gleichen Kystoms in der Zellkultur 3 Tage nach Explantation

Ausschnittsvergrößerung eines Granulosazelltumors, kleinzellig und stellenweise Wirbelstruktur aufweisend



Zellen des gleichen Tumors in der Zellkultur 6 Tage nach Explantation



Ausschnittsvergrößerung eines metastatischen papillomatösen Ovarial-Carcinoms der Gruppe IV,
Metastasierung ins Peritoneum

Zellen des gleichen Carcinoms in der Zellkultur 4 Tage nach Explantation

## II. Methodik der Autoradiographie und Kriterien ihrer Anwendung:

Mit Hilfe der Autoradiographie werden Radioisotope nachgewiesen, die beim direkten Zusammenprall mit Silberbromid-Kristallen einer Filmemulsion Elektronen aus den Bromidionen lösen. Diese wandern innerhalb des Kristalles zu exponierten Stellen, von denen auch Silberionen angezogen werden, die sich dort ablagern. Bei Entwicklung der Filmemulsion werden die Silberionen zu metallischem Silber reduziert, wodurch diese Kristalle als schwarze Granula sichtbar werden.

Ein mit Radioisotopen inkubierter histologischer Schnitt - in unserem Fall eine einschichtig ausgewachsene Zellkultur - wird mit einer photographischen Filmemulsion in Kontakt gebracht. Zur Sichtbarmachung der Isotopen ist eine bestimmte Strahlungsdauer, die Expositionszeit, erforderlich.

Nach Entwicklung der Emulsion findet sich eine Ansammlung schwarzer Granula über solchen Stellen der Gewebekultur, die radioaktives Material enthalten. Indem man das photographische Bild mit der Gewebekultur vergleicht, können diese Aktivitätszentren bestimmten

histologischen Strukturen zugeordnet werden. Dabei muß man sich vor Augen halten, daß es sich lediglich um eine Projektion der radioaktiven Substanz in die über der Gewebekultur liegenden Filmemulsion handelt, wobei die Zuordnung der Aktivitätszentren zu bestimmten Einbauprozessen innerhalb der jeweiligen Teilungsphase der Zelle problematisch ist. Eine Lokalisation nach rein morphologischen Gesichtspunkten ist jedoch unter Beachtung der folgenden Kriterien möglich:
Da jeweils mehrere Bezirke vermehrter Granulierung in der Filmemulsion über der Zellstruktur zu erwarten sind, bereitet die Unterscheidung von mehreren, nahe beieinander liegenden markierten Stellen Schwierigkeiten. Je näher diese Stellen vermehrter Dichte beieinander liegen und noch voneinander unterschieden werden können, um so besser ist das Auflösungsvermögen der Methode. Auflösungsvermögen und Dichte (7) hängen von folgenden [illegible] ab:

1. Geometrische Beziehung zwischen radioaktiver [illegible] und der in der Emulsion:

   Theoretisch und experimentell ist erwiesen,

daß eine geringe Dicke des histologischen Präparates und ein möglichst geringer Abstand zwischen der Strahlenquelle und Filmemulsion die beste Auflösung und die größte Körnerdichte ergeben. Die Dicke der Filmemulsion ist dagegen von geringerer Bedeutung.

Strahlungsenergie und Strahlungsintensität:

In Abhängigkeit des zurückgelegten Weges des von dem Isotopen ausgesandten ß-Partikels und des damit verbundenen Energieverlustes verändert sich die photographische Schwärzung so, daß die Granulaschichte am Ende der Spur des ß-Partikels am größten ist. Die Strahlungsmenge und damit die Intensität kann durch die Expositionszeit gesteuert werden, wobei sich gezeigt hat, daß eine möglichst geringe Expositionsdauer für eine optimale Auflösung des photographischen Bildes notwendig ist.

Eigenschaften der photographischen Emulsion:

a. Körnergröße:

Um eine möglichst genaue Lokalisation zu erreichen, sind feinkörnige Emulsionen den grobkörnigen vorzuziehen, obwohl

letztere eine höhere Filmempfindlichkeit bewirken.

b. Körnerkonzentration:

Je größer die Körnerkonzentration ist, um so größer ist auch die maximal erreichbare Dichte. Gleichzeitig wird dadurch auch die Filmempfindlichkeit verbessert.

c. Entwicklung und Fixation:

Um ein besseres Auflösungsvermögen zu erreichen, wird eine Flüssigkeitstemperatur von 18 bis 20° C empfohlen.

d. Background:

Darunter versteht man die Körnerdichte, die man erhält, wenn nicht bestrahlte Teile der Emulsion entwickelt werden. Jede Emulsion enthält eine gewisse Anzahl von Körnern, die sich spontan, d. h. ohne Licht - oder Isotopeneinwirkung - entwickeln. Experimentell hat sich gezeigt, daß eine geringe Emulsionsdicke den background reduziert, ohne die eigentliche Körnerdichte zu beeinflussen.

Die hier angegebene Methode ist allgemein anwendbar, muß jedoch entsprechend der jeweiligen Problemstellung variiert werden.

III. Präparation des Tumorgewebes:

Bei der Aufarbeitung der einzelnen Tumoren gingen wir folgendermaßen vor:

1. Fermentative Aufschließung:

   Das Tumorgewebe wurde fermentativ (4) durch Trypsin aufgeschlossen (14). Dadurch werden die Tumorzellen völlig vermischt und wachsen unter Verwendung einer für gynäkologische Tumoren entwickelten Nährlösung (15) als einschichtiger Zellrasen auf Kulturröhrchen oder auf Glimmerplättchen in Leightontubes aus.

2. Nährmedium:

   Zusammensetzung (18):

| | |
|---|---|
| TCM 199 (Morton-Morgan-Parker) | 25 % |
| Kälberserum | 10 % |
| MEM-Vitaminlösung | 5 % |
| Glutamin 10 % | 5 % |
| Hanks-Lösung | 55 % |

3. Züchtung des Tumorgewebes:

   Ein Teil des Materials wurde für die Resistenzprüfung gegenüber einem Spektrum von Zytostatika auf Kulturröhrchen gegeben. Der andere Teil der Tumorzellen wurde für Einbaustudien auf Glimmerplättchen in Leightontubes angezüchtet. Nach flächen-

haftem Auswachsen der Gewebekulturen zu einem einschichtigen Zellrasen erfolgte nach 3 bis 4 Tagen eine Inkubation mit dem $H^3$-Äthylhydrazid der Podophyllinsäure für die Dauer von 24 Stunden (5, 19, 26).

4. Aktivität und Konzentration des SP-I in der Nährlösung:

Die Aktivität pro ml Nährmedium betrug 4,5 µ C. Die Konzentration war 20 Gamma Wirksubstanz auf 1 ml Nährlösung in der Gewebekultur. Dies entspricht einer therapieadäquaten Dosis von 25 bis 30 mg pro kg Körpergewicht bei Anwendung der Stoßtherapie, die einem Patienten von 60 kg Körpergewicht und einem mittleren Blutvolumen von 5000 ml verabreicht wird (18).

5. Aufarbeitung der Testpräparate:

Da bei der Untersuchung nur die fest an die Zellstrukturen intrazellulär eingebaute markierte Substanz erfaßt werden sollte, wurde auf Anwendung der Tiefgefriertechnik (19) verzichtet.

Nachdem der an der Zelloberfläche haftende Teil des $H^3$-Proresids mit Nährlösung abgespült worden war, erfolgte die Fixation der Präparate mit Äther-Alkohol (50:

50), wobei pro Liter Fixierlösung ein Tropfen Essigsäure (99,9 %) zugefügt wurde.

6. Autoradiographische Aufarbeitung der Präparate:

Die Kulturen wurden dadurch mit der Filmemulsion beschichtet, daß die auf Objektträger aufgebrachten Zellmonoplättchen in die 1:3 mit Aqua bidest. verdünnte Filmlösung, ILFORD G 5, eingetaucht wurden. Die Expositionszeiten betrugen 2 bis 3 Wochen, die Aufbewahrung der Präparate erfolgte in Objektträgerkästen, denen $CuSO_4$ zur Feuchtigkeitsabsorption beigefügt war. Zur Vermeidung von Strahleneffekten wurden die Kästen in Staniol- und schwarzem Papier verpackt und im Eisschrank bei 4° C aufbewahrt.
Das Präparat wurde bei 20° C entwickelt und fixiert, und im Anschluß daran nach Papanicolaou gefärbt.

7. Auswertung der Präparate:

Zur Auswertung der Silberkornschwärzung in den Präparaten wurden zunächst die Volumenanteile der Zellkompartimente, Nukleus und Zytoplasma morphometrisch nach dem Vorgehen von H. SMITE (25) an mindestens 10 Zellen

pro Präparat bestimmt.

Um Unterschiede in der Zellkerngröße und dem Zytoplasmaanteil zwischen verschieden großen Tumorzellen auszugleichen, wurde die Silberkornzahl prozentual umgerechnet auf den Anteil der einzelnen Zellkompartimente am Gesamtvolumen der Zelle. Die Zahlenangaben in Prozent sind also auf morphometrisch bestimmte gleiche Volumenanteile unterschiedlich großer Zellen bezogen. Der natürliche background wurde von dieser Berechnung abgezogen. Siehe Tabelle 1

5. Morphometrische Beurteilung der Präparate:

Die morphologische Beurteilung von 200 Zellen pro Kultur wurde nach Schädigungsgraden vorgenommen.

Folgende vier Stadien wurden dabei unterschieden:

a. keine Schädigung

b. geringe Zytoplasmaveränderungen
(= reversibler Zellschaden)

c. Mitosehemmung

d. vollständige Zellnekrose

Aus der Relation der ungeschädigten zu den geschädigten Zellen ergibt sich der prozentuale Anteil von resistenten und sensiblen Zellen in einem Tumor. Siehe Tabelle 2

IV. Methodenkritik:

Bei der hier angewandten Methode wurde eine geringe Dicke des Präparates und damit ein gutes Auflösungsvermögen bei Vorliegen einschichtig ausgewachsener Zellkulturen erhalten. Dadurch, daß die Kulturen direkt mit der Filmemulsion überschichtet wurden, konnte der Abstand Strahlungsquelle - Emulsion gering gehalten werden, was ebenfalls zu einer Verbesserung der Auflösung beitrug.

Durch die Verwendung der Filmemulsion ILFORD G 5 wurden standardisierte und autoradiographisch bewährte Bedingungen vorgefunden.

Weitere Fehlerquellen (22) wurden durch folgendes Vorgehen ausgeschlossen:

1. Strahlenbedingte morphologische Schädigungen, die durch Verwendung zu großer Mengen Isotope entstehen:
   Zu jeder Tumorkultur wurden mit nicht markiertem Proresid (SANDOZ) behandelte Kontrollen hergestellt und zum morphologischen Vergleich gegenüber dem markierten Gewebe herangezogen. Dabei fanden sich keine wesentlichen, durch die Strahlung

hervorgerufenen morphologischen Veränderungen.

2. Schäden, die bei der histologischen Aufarbeitung eines Schnittes entstehen:
   a. Eine Beeinflussung der Emulsion durch Einbettungsmaterial entfällt bei der Verwendung von Zellkulturen, eine Artefaktbildung durch das verwandte Nährmedium oder die Fixationsflüssigkeit ließ sich bei der vorliegenden Untersuchung nicht feststellen.
   b. Eine Diffusion der radioaktiven Substanz in die Emulsion war nicht zu befürchten, da nur die intrazellulär eingebaute markierte Substanz erfaßt wurde. Das an der Oberfläche haftende SP-I wurde durch die Nährlösung weggespült.
   c. Artefakte, die durch den Austritt intrazellulärer Enzyme hervorgerufen werden, wurden durch den Zusatz eines Tropfens Essigsäure 99,9 % zu einem Liter Fixationslösung vermieden. Hierdurch wurde eine Nachbehandlung der Präparate im Vakuumexsikkator zur Entfernung der Essigsäure notwendig, da

diese sonst ihrerseits eine Filmschwärzung bewirkt.

3. Artefakte durch Verwendung geschädigter oder alter Emulsionen:

   Dieser Fehler konnte durch Verwendung jeweils frisch angesetzter Filmemulsionen vermieden werden.

4. Artefakte, die während der Expositionszeit auftreten können, wurden anhand der nicht markierten mitgeführten Kontrollen identifiziert. Dadurch konnte eine etwaige Eigenschwärzung durch die Zellkultur selbst ausgeschlossen werden.

5. Artefakte, die während der Entwicklung und Fixierung entstehen können, wurden durch Vermeidung mechanischer Insulte, Verwendung frischer Lösungen und möglichst staubfreier Aufarbeitung mit großer Sicherheit vermieden.

C. ERGEBNISSE:

Die im standardisierten Krebs-Chemotherapie-Resistenztest (18) untersuchten Gewebearten wiesen bezüglich ihrer morphologischen Veränderungen ein unterschiedliches Verhalten auf, wie es entsprechend der Tumorindividualität bekannt ist und erwartet wurde.
Bei den sieben untersuchten Tumoren fand sich im Resistenztest folgendes Ergebnis:

| Histologie | Resistenz-Test | |
|---|---|---|
| Vulva-Carcinom | ++ | (sensibel) |
| Ovarial-Carcinom | ++ | |
| Ovarial-Carcinom | + | |
| Maligner Granulosa-Zelltumor | + | |
| Portio-Carcinom | ø | (resistent) |
| Benignes Ovarial-Kystom | ø | |
| Corpus-Carcinom | ø | |

++ cytotoxische Wirkung auf die Zellproliferation
+ cytostatische Wirkung auf die Zellproliferation
ø keine Wirkung auf die Zellproliferation

Aus obiger Tabelle ist ersichtlich, daß vier der sieben Tumoren -
das Carcinom der Vulva,
die beiden Ovarial-Carcinome und
der maligne Granulosazelltumor -
durch die zytostatische Substanz in ihrem Zellwachstum sehr stark - gekennzeichnet durch ++ -

bis stark - gekennzeichnet durch + - geschädigt waren.

Die drei anderen untersuchten Tumoren,

das Carcinom der Portio uteri

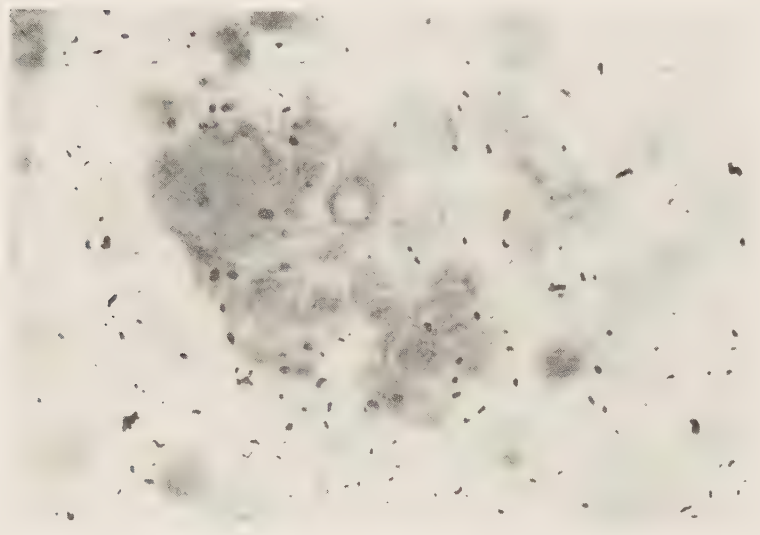
das benigne Ovarialkystom und

das Carcinom des Corpus uteri,

ließen, soweit morphologisch faßbar, keine Beeinflussung hinsichtlich ihrer Proliferationskinetik erkennen, was durch Ø gekennzeichnet wurde. Sie erwiesen sich gegenüber dem Äthylhydrazid der Podophyllinsäure als vollständig resistent.

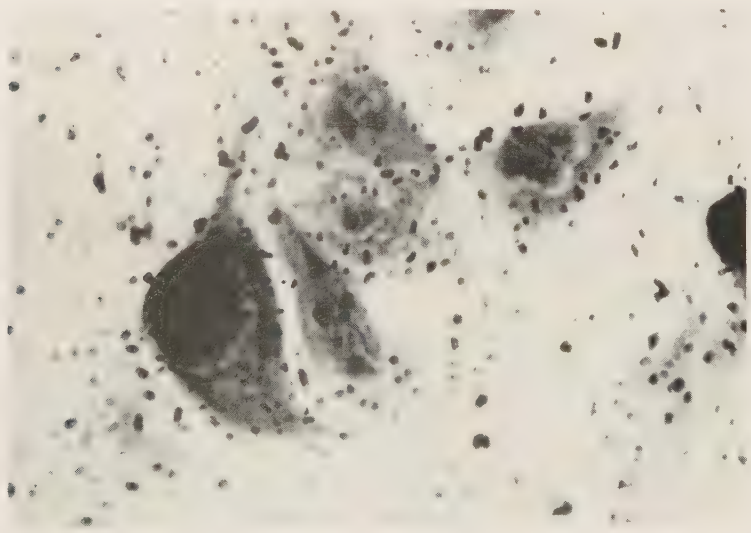
Bei Auswertung der mit Tritium markierten Proresid (SANDOZ) behandelten und autoradiographisch aufgearbeiteten Zellkulturen fanden sich jedoch in allen Präparaten, auch in stark geschädigten, neben den verschiedenen Formen der durch Zytoplasma- und Kernveränderungen gekennzeichneten Zellschädigungen eine unterschiedlich große Zahl ungeschädigter, resistenter Zellen.
Zur Verdeutlichung zeigen die beiden nachfolgenden Übersichtsaufnahmen in zwei verschiedenen Vergrößerungen resistente und sensible Zellen aus einem benignen Ovarialkystom in einer autoradiographisch aufgearbeiteten Zellkultur.

Autoradiographische Übersichtsaufnahmen eines benignen Ovarialkystoms:



Tumorzellen in der Vergrößerung 16 x 8 x 1,2 nach Einwirken des $H^3$-SP-I für 24 Stunden

Expositionszeit: 3 Wochen



Tumorzellen in der Vergrößerung 40 x 8 x 1,2 nach Einwirken des $H^3$-SP-I für 24 Stunden

Expositionszeit: 3 Wochen

Im autoradiographischen Bild sind die Zellveränderungen durch eine unregelmäßige Verteilung und Dichte der Silberkörner über dem Zytoplasma gekennzeichnet. Auffallend ist hierbei, daß die Vakuolenbildung im Zytoplasma mit einer Vermehrung der Silberkörner, d. h. mit einer Zunahme der Strahlungsintensität, über diesen Strukturen einhergeht. Kommt es zur Ausbildung von Zellnekrosen, findet sich neben obigen Veränderungen auch eine Zunahme der Aktivität über dem Zellkern. Einen entsprechenden Befund weisen auch die verschiedenen Formen der Mitosehemmung auf.

In den folgenden Abbildungen werden die für die einzelnen getesteten Kulturen typischen Zellveränderungen dargestellt.
In allen Kulturen, ob resistent oder sensibel, treten jeweils alle Grade von Zellschädigungen in dem entsprechenden autoradiographischen Bild auf. Daraus läßt sich ableiten, daß lediglich das quantitative Verhältnis der sensiblen zu den resistenten Zellen einen Rückschluß auf das Gesamtwachstumsverhalten der Kultur zuläßt.

Abbildung : 1

Zellen eines menschlichen Vulva-Carcinoms in vitro, 24 Stunden nach Inkubation mit $H^3$-Äthylhydrazid der Podophyllinsäure, 4,5 /µC / ml Nährmedium.

Resistenztest: sehr starke Zellschädigung (++)

Ölimmersion 960fach

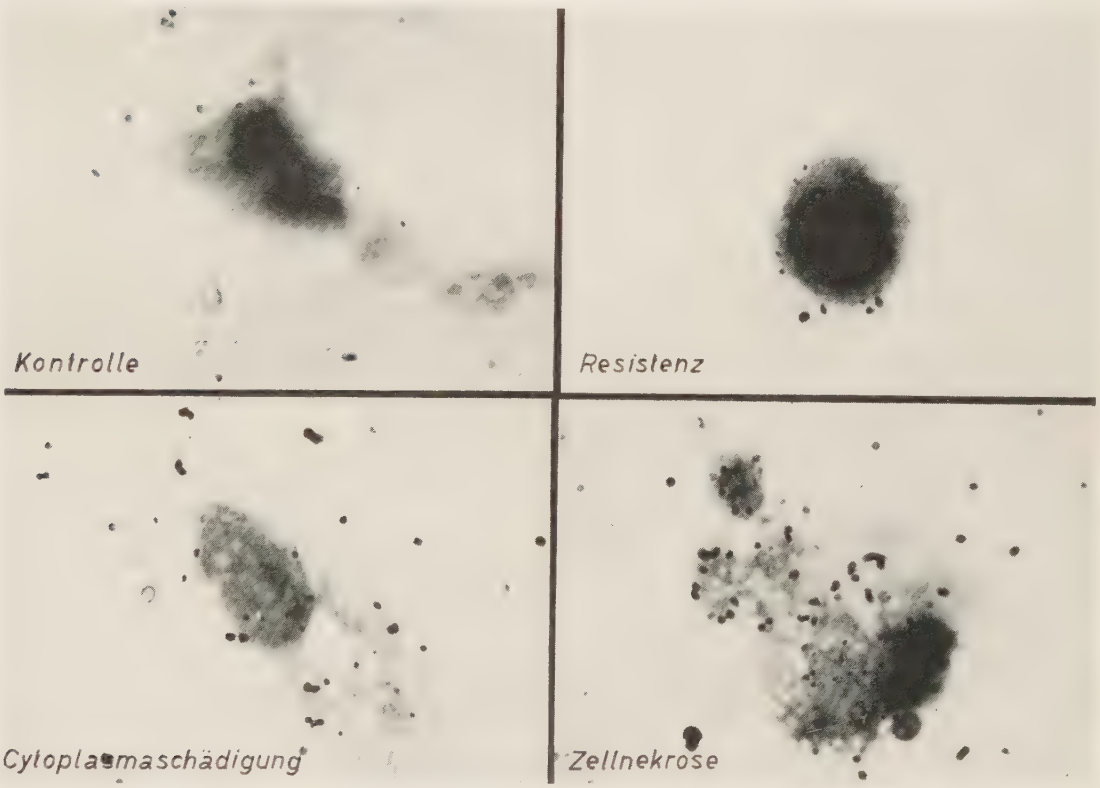


Abbildung : 2

Zellen eines menschlichen Adeno-Carcinoma ovarii in vitro, 24 Stunden nach Inkubation mit $H^3$-Äthylhydrazid der Podophyllinsäure, 4,5 µC / ml Nährmedium.

Resistenztest: sehr starke Zellschädigung (++)

Ölimmersion 960fach

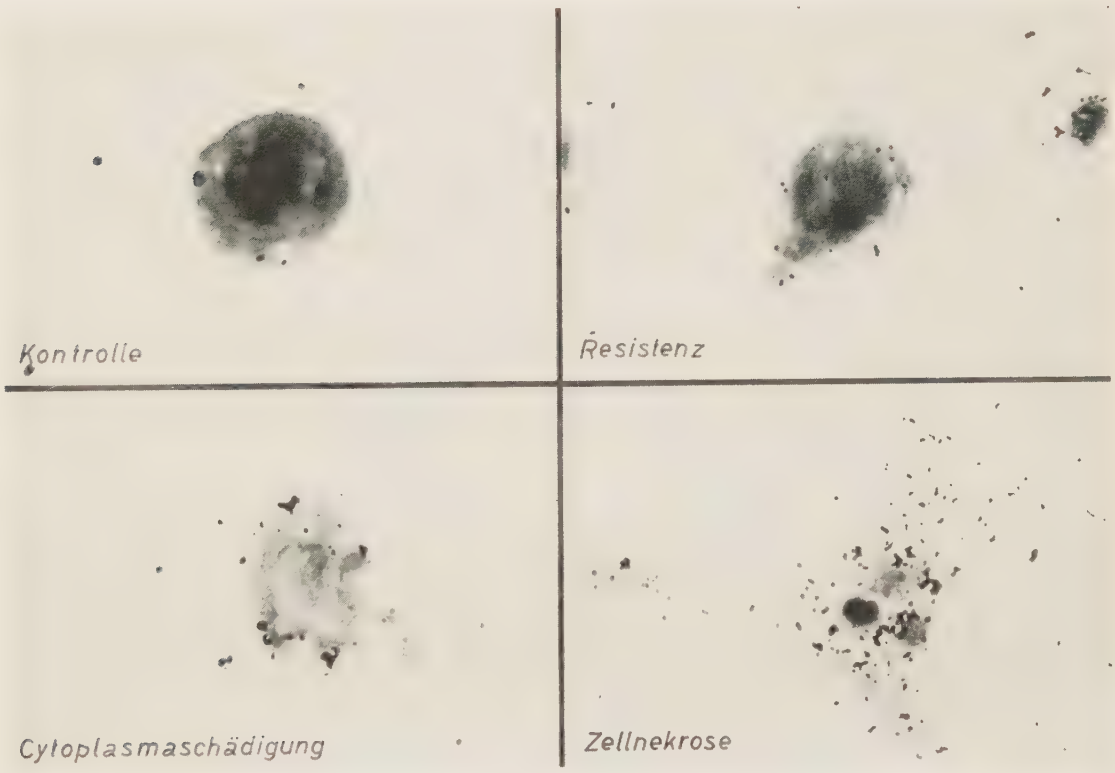


Abbildung : 3

Zellen eines menschlichen, malignen Granulosazelltumors in vitro, 24 Stunden nach Inkubation mit $H^3$-Äthylhydrazid der Podophyllinsäure, 4,5 /uC / ml Nährmedium.

Resistenztest: starke Zellschädigung (+)

Ölimmersion 960fach

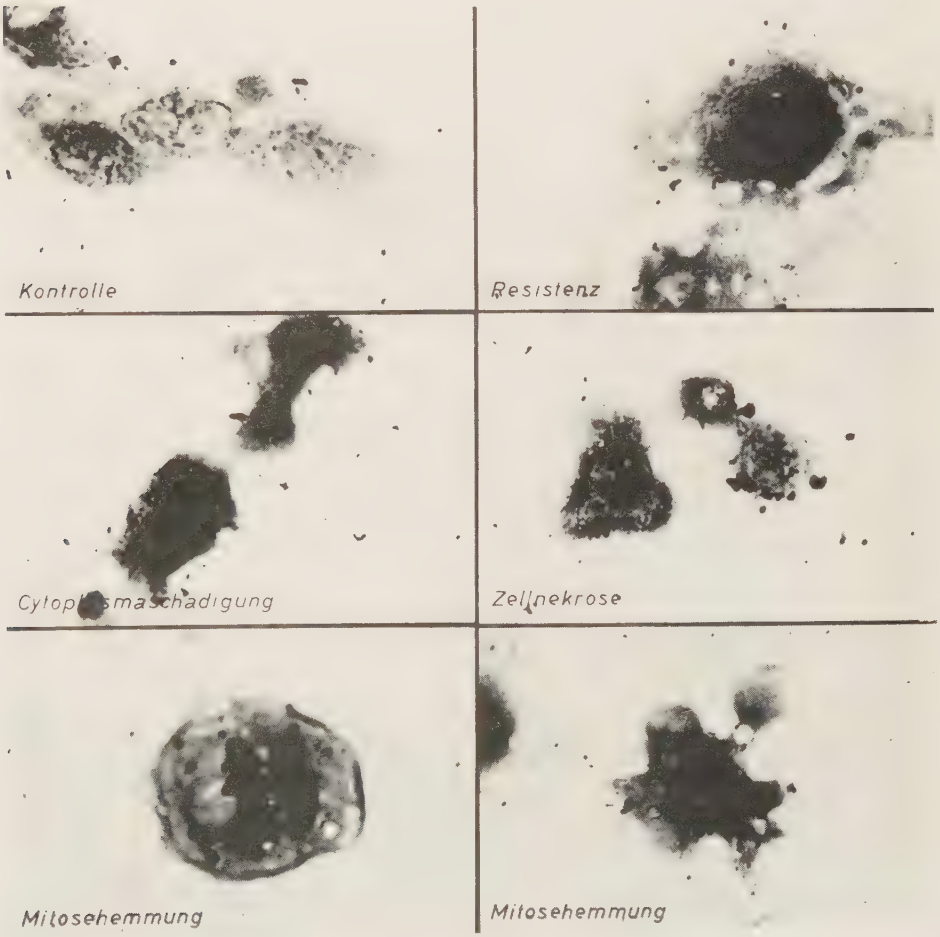


Abbildung : 4

Zellen eines Plattenepithelcarcinoms der menschlichen Portio in vitro, 24 Stunden nach Inkubation mit $H^3$-Äthylhydrazid der Podophyllinsäure, 4,5 /uC / ml Nährmedium.

Resistenztest: keine Störung der Zellproliferation

resistene Kultur (Ø)

Ölimmersion 960fach

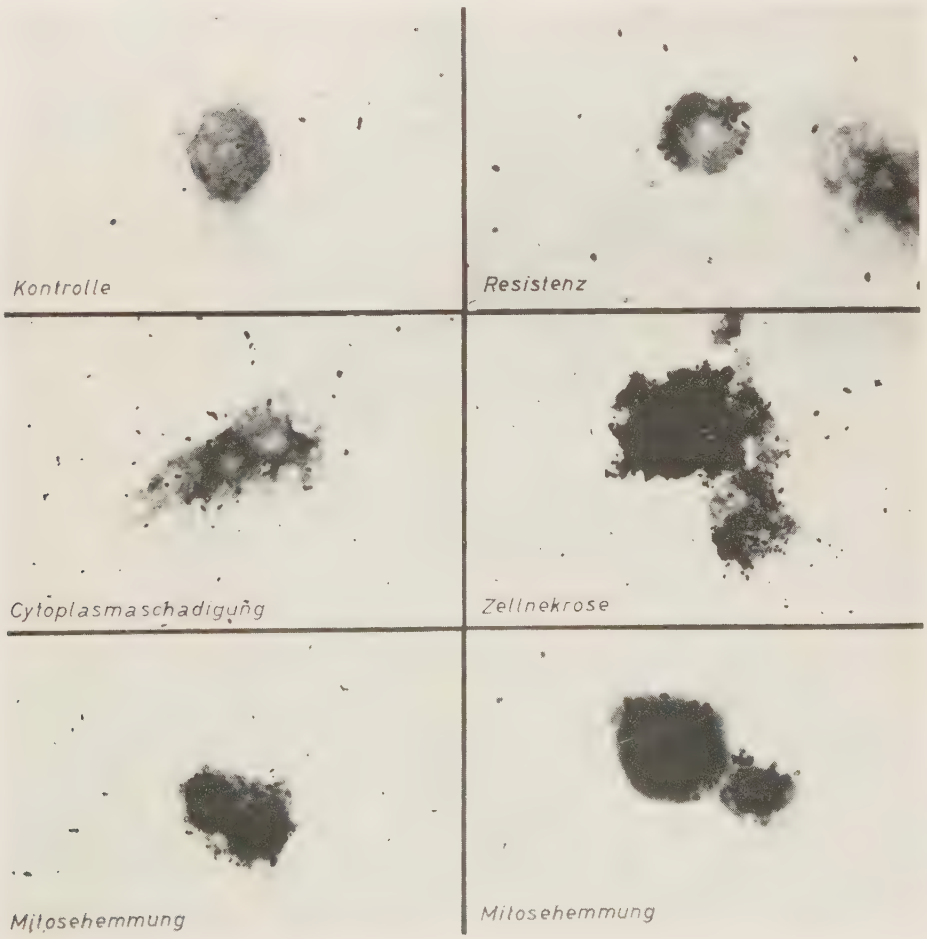


Abbildung : 5

Zellen eines menschlichen, benignen Ovarial-kystoms in vitro, 24 Stunden nach Inkubation mit $H^3$-Äthylhydrazid der Podophyllinsäure, 4,5 /uC / ml Nährmedium.

Resistenztest: keine Störung der Zellproliferation
resistente Kultur (Ø)

Ölimmersion 960fach

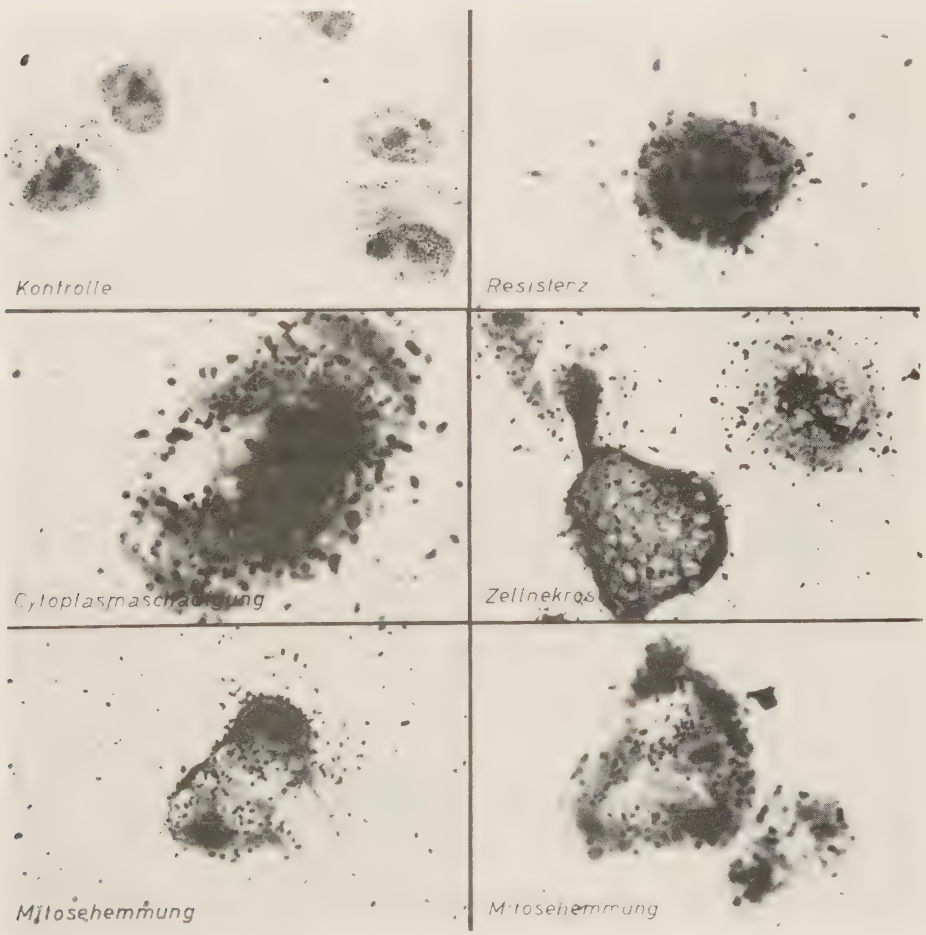


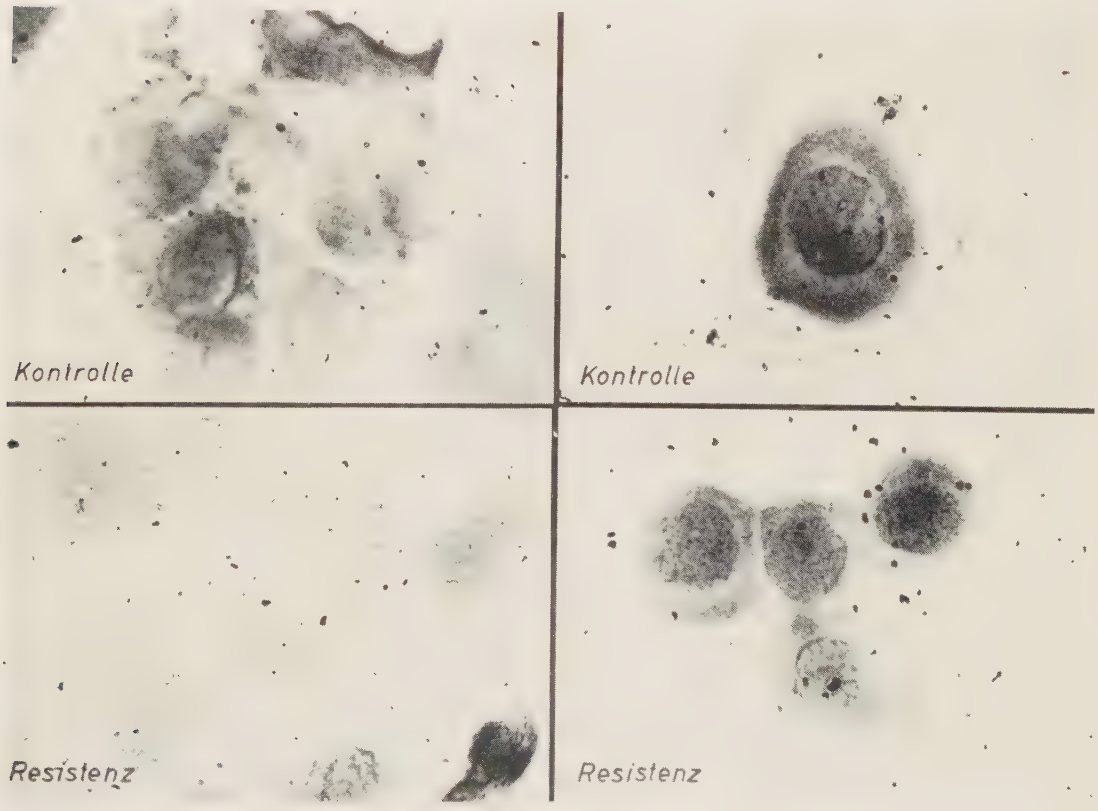
Abbildung : 6

Zellen eines menschlichen Adenocarcinoma corporis uteri in vitro, 24 Stunden nach Inkubation mit $H^3$-Äthylhydrazid der Podophyllinsäure, 4,5 /uC / ml Nährmedium.

Resistenztest: keine nachweisbare Zellschädigung

resistente Kultur (ø)

Ölimmersion 960fach



Bei der durchgeführten quantitativen Auswertung der Granulaverteilung über gleichen Volumenanteilen der einzelnen Zellkompartimente ist zu erkennen, daß auch bei morphologisch nicht geschädigten Zellen, nach Abzug des natürlichen background, in geringer Zahl Silberkörner über dem Zytoplasma, gelegentlich auch über dem Zellkern gefunden werden. Zellen mit geringen Zytoplasmaveränderungen zeigen eine unregelmäßige Verteilung der Granula über dem Zytoplasma, vereinzelt sind diese auch nahe der Kernmembran vermehrt nachweisbar. Die Anreicherung der Silberkornschwärzung über den Zytoplasmavakuolen weist auf einen möglicherweise reversibel ablaufenden Zellschaden hin, wie er auch von anderen Autoren (26) diskutiert wird. Eine aktive Ausschließung von zytostatischen Substanzen aus dem Zytoplasma durch Pinocytose und ihre perinukleäre Anreicherung an der Barriere der Kernmembran können als mögliche Abwehrfunktion der reversibel geschädigten Zelle aufgefaßt werden. Mit dieser Annahme ist auch die Möglichkeit einer sich unter Zytostatikabehandlung entwickelnden Resistenz der Tumorzellen denkbar. Bei Eintritt einer Zellnekrose findet sich eine gleichmäßig starke Zunahme der $H^3$-Podo-

phyllinaktivität über sämtlichen Strukturen, wobei besonders die Vermehrung der Silberkörner über dem Zellkern auffallend ist. Damit sind die Zellfunktionen irreversibel geschädigt.

Tabelle : 1

*Verteilung von $H^3$-Aethylhydrazid der Podophyllinsäure in Carcinomzellen des weiblichen Genitale in vitro. Zahl der Granula bezogen auf morphometrisch bestimmte gleiche Volumenanteile der Zellkompartimente.*

| Gewebeart | Resistenz Test | keine Schädigung | | | geringe Cytoplasmaveränderung | | | Mitosehemmung | | | Zellnekrose | | | n |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Cytoplasma | Nucleus | Vakuolen | Cytoplasma | Nucleus | Vakuolen | Cytoplasma | Nucleus | Vakuolen | Cytoplasma | Nucleus | Vakuolen | |
| Vulva-Ca | ++ | 5 | – | – | 15 | 7 | 17 | – | – | – | 26 | 31 | 29 | 10 |
| Ovarial-Ca | ++ | 7 | – | – | 17 | 6 | 16 | 4 | – | – | 38 | 19 | 28 | 10 |
| Ovarial-Ca | + | 14 | 3 | – | 23 | 11 | – | – | – | – | 28 | 18 | 84 | 10 |
| Maligner Granulosa-Zelltumor | + | 6 | – | – | 9 | 2 | – | 13 | 12 | – | 33 | 16 | 103 | 10 |
| Portio-Ca | 0 | 5 | – | – | 14 | 7 | 24 | – | – | – | 31 | 28 | 43 | 10 |
| Ovarial Kystom | 0 | 27 | 6 | – | 27 | 10 | 25 | 35 | 32 | 26 | 40 | 24 | 60 | 10 |
| Corpus-Ca | 0 | 4 | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 10 |

Verteilung von $H^3$-Äthylhydrazid der Podophyllinsäure in Carcinomzellen des weiblichen Genitale in vitro.

Die Zahl der Granula ist auf morphometrisch bestimmte gleiche Volumenanteile der Zellkompartimente bezogen.

In Tabelle 2 wurden die morphologisch faßbaren Veränderungen

keine Schädigung,
geringe Zytoplasmaveränderungen,
Mitosehemmung und
Zellnekrose

24 Stunden nach Einwirken des mit Tritium markierten Äthylhydrazid der Podophyllinsäure aufgeführt.

Bei jedem der vorliegenden Tumoren wurden jeweils 200 Zellen ausgezählt und ihre Zugehörigkeit zu den einzelnen Stadien der Schädigung in Prozent der Gesamtzahl angegeben. Im Vergleich mit dem Chemotherapie-Resistenztest zeigt sich, daß die Relation der ungeschädigten resistenten zu den geschädigten sensiblen Tumorzellen einen Rückschluß auf die Ansprechbarkeit eines Carcinomgewebes gegenüber einer Chemotherapie mit Zytostatika erlaubt.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist bei einem 3- bis 4fachen Anteil der sensiblen Zellen an der Gesamtpopulation des Tumors mit einer sehr starken Schädigung der Zellproliferation zu rechnen.

Nimmt der Anteil der sensiblen Zellen an der Gesamtpopulation auf das 2fache ab, ist noch eine morphologisch nachweisbare Hemmung des

Tumors möglich.

Ein resistentes Verhalten des Tumors gegenüber dem Zytostatikum ist dann zu erwarten, wenn der Anteil der sensiblen Zellen am Tumor weiter auf das 1,5fache der resistenten Zellen absinkt.

Tabelle : 2

*Morphologische Zellveränderungen bei weiblichen Genitalcarcinomen nach Inkubation mit $H^3$-Aethylenhydrazid der Podophyllinsäure in %.*

| Histologie | Resistenz Test | keine Schädigung | geringe Cytoplasma Veränderung | Mitose-hemmung | Zell-nekrose | Zellen resistent : sensibel |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Vulva - Carcinom | ++ | 21 | 41 | 3 | 35 | 1 : 3,76 |
| Ovarial-Carcinom | ++ | 22 | 40 | 3 | 35 | 1 : 3,54 |
| Ovarial Carcinom | + | 29 | 40 | 3 | 28 | 1 : 2,45 |
| Maligner Granulosa-Zelltumor | + | 33 | 30 | 8 | 29 | 1 : 2,03 |
| Portio-Carcinom | Ø | 41 | 38 | 5 | 16 | 1 : 1,44 |
| Ovarial Kystom benigne | Ø | 52 | 23 | 11 | 14 | 1 : 0,92 |
| Corpus-Carcinom | Ø | 69 | 23 | 2 | 6 | 1 : 0,45 |

Morphologische Zellveränderungen bei weiblichen Genitalcarcinomen nach Inkubation mit dem $H^3$-Äthylhydrazid der Podophyllinsäure in %.

## D. DISKUSSION:

Nach der Ansicht von LETTRE kann in einer Zellpopulation, die resistente und sensible Zellen im gleichen Tumor enthält, eine Selektion der resistenten Formen erst dann stattfinden, wenn das Gleichgewicht ihrer Vermehrungsgeschwindigkeit durch ein künstliches Hemmsystem gestört wird. Durch die Anwendung eines für die sensiblen Zellen spezifisch wirksamen Medikamentes können die resistenten Formen erkannt und selektioniert werden (11, 12).

In der vorliegenden Untersuchung konnte mit Hilfe der Gewebekultur unter Verwendung von mit Tritium markierten Proresid (SANDOZ) an menschlichen Tumoren der Nachweis erbracht werden, daß es unter Einwirkung eines künstlichen Hemmsystemes, in diesem Falle des Äthylhydrazids der Podophyllinsäure, zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes der einzelnen Zellqualitäten zueinander kommt. Dabei ist es jedoch unmöglich, aus dem Verhalten einer Einzelzelle Rückschlüsse auf das Verhalten der Gesamtkultur zu ziehen. Aufgrund unserer Untersuchungen kann ein resistentes Verhalten des Tumors aber dann

erwartet werden, wenn bei dieser Verschiebung ein kritischer Grenzwert, der sich im Zahlenverhältnis von 1,0 resistenten zu 1,5 sensiblen Zellen ausdrückt, überschritten wird.

Der Einfluß eines künstlichen Hemmsystemes auf intrazelluläre Regulationssysteme des Zellwachstums und ihre Rückwirkungen auf die Wachstumsgeschwindigkeit verschiedener Zellqualitäten, die bisher an den experimentell zu erzeugenden Resistenzformen von Tiertumoren nachgewiesen wurden (1, 10, 12, 13, 20), konnen aufgrund des hier vorliegenden Untersuchungsergebnisses auch auf menschliches Tumorgewebe übertragen werden.

Während die Tumorzelle selbst, im Vergleich zur normalen Körperzelle, schon als eine Resistenzform gegenüber dem physiologischen Regulationssystem des Organismus angesehen werden kann (1, 13), ist die Selektion resistenter Tumorzellen nach Einwirkung eines künstlichen Hemmsystemes, z. B. eines Zytostatikums, Ausdruck einer weiteren Adaptionsfähigkeit bestimmter Tumorzellen gegenüber exogener Noxen.

Die spezifische Eigenschaft der Resistenz einer kanzerisierten Zelle gegenüber dem

Carcinogen und einer Carcinomzelle gegenüber einem Zytostatikum kennzeichnen stufenförmige Entwicklungsschritte im molekularen Bereich der genetischen Information einer Carcinomzelle (1, 21, 23).
Eine Änderung dieser zellulären Regulation unter dem chemischen Einfluß des Äthylhydrazid der Podophyllinsäure wurde an der Proliferationsaktivität der Tumorzellen und an dem unterschiedlichen autoradiographischen Bild sensibler und resistenter Tumorgewebe nachgewiesen.

## E. ZUSAMMENFASSUNG:

Autoradiographische Untersuchungen, die mit Hilfe der Gewebekultur unter Verwendung von mit Tritium markiertem Äthylhydrazid der Podophyllinsäure an menschlichen Tumoren des weiblichen Genitale vorgenommen wurden, haben gezeigt, daß Häufigkeit und Verteilung der Silberkornschwärzung über den morphometrisch bestimmten Zellkompartimenten als Ausdruck einer morphologisch erkennbaren Zellschädigung durch eine zytostatische Substanz anzusehen sind.

Das Verhältnis der sensiblen zu den resistenten Zellen weist für jeden Tumor unterschiedliche Werte auf, die dem jeweiligen individuellen Verhalten des Tumors gegenüber der Behandlung mit Zytostatika entsprechen.
Ist die resistente Zellart in einem Zahlenverhältnis 1,0 resistenter zu 1,5 sensibler Zellen vorhanden, und vermehrte sie sich über diesen kritischen Wert hinaus, so ist das "Gleichgewicht" des Tumorgewebes (11) zu Gunsten der Resistenz gestört.

Morphologisch erkennbare Zellschädigungen sind bei Vorliegen eines solchen Zahlenverhältnisses nach Einwirken der zytostatischen Substanz nicht mehr nachweisbar. Das Wachstum des Tumors erfolgt unkontrolliert durch eine ungehemmte Vermehrung resistenter Zellen.

# LITERATURVERZEICHNIS


1. BÜCHNER, F., GRUNDMANN, E. u. W. OEHLERT:
Die experimentelle Kanzerisierung der Parenchymzelle.
Dtsch.med.Wschr. 86, 1645-1650 (1961)

2. DAVIS, B.D. u. W.K. MAAS:
Analysis of the Biochemical Mechanism of the Drug-Resistance in Certain Bacterial Mutans.
Proc.Nat.Acad.Sc. 38, 775-785 (1952)

3. DRUCKREY, H.:
Chemotherapie des Krebses. Experimentelle Grundlagen.
Klin.Wschr.33.Jg., Heft 33/34, 764-792 (Sept. 1955)

4. DULBECCO, R., u. M. VOGT:
Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis virus.
J.exp.Med. 99, 167-182 (1954)

5. EMMENEGGER, H., STÄHELIN, H., RUTSCHMANN, J., RENZ, J. u. A. v. WARBURG:
Zur Chemie und Pharmakologie der Podophyllum-Glucoside und ihrer Derivate.
Arzneim.Forsch. 11, 327-333, 459-469 (1961)

6.
Expose über die Zytostatika SP-I, SP-G.
Sandoz
November 1963

7. GROSS, J., BOGOROCH, R., NADLER, N.J. u. C.P. LEBLAND:
The Theory and Methods of the Radioautographie Localization of Radioelements in Tissues.
Am.J.Roentg. 65, 420-458 (1951)

8. HECKMANN, U.:
A New Method in -Vivo-Test for Assessing the Resistance of Human Carcinoma to Cytostatic Agents.
German Medical Monthly, Vol XIII, Nr. 5, 220-225 (May 1968)

9. HECKMANN, U., TRANEKJER, A.S.:
Frühveränderungen an Interphasezellen von weiblichen Genitalkarzinomen nach Proresid$^{R}$ (SP-I - SANDOZ)
Krebsforschung und Krebsbekämpfung Band VI

10. LAWLEY, P.D. u. P. BROOKES:
Molecular Mechanism of the Cytotoxic Action of Difunctional Alkylation Agents and of Resistance to this Action.
Nature 206, 480-483 (1965)

11. LETTRE, H.:
Die Bedeutung des Resistenzphänomens für das Krebsproblem.
Naturw. 43, 162-163 (1956)

12. LETTRE, H.:
Spezifische Eigenschaften von Tumorzellen.
Wien.med.Wschr. 1958, 791-794

13. LETTRE, H.:
Probleme der Regulation bei der Krebskrankheit.
Materia Medica Nordmark XIX/10, 553-565 (1967)

14. LIMBURG, H. u. M. KRAHE:
Die Züchtung von menschlichem Krebsgewebe in der Gewebekultur und seine Sensibilitätstestung gegen neuere Zytostatika.
Dtsch.med.Wschr. 89, 1938 (1964)

15. LIMBURG, H. u. M. KRAHE:
Untersuchungen zur Sensibilitätstestung von menschlichen Carcinomgeweben gegenüber neueren Chemotherapeutika.
IIIrd. Int. Congress of Chemotherapy Stuttgart 1963
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1964

16. LIMBURG, H. u. U. HECKMANN:
Klinische Ergebnisse einer selektiven Chemotherapie bei Malignomen des weiblichen Genitales.
Int. Kongress Chemotherapie (1967) p. 457-465 (A IV - 4/11)

17. LIMBURG, H. u. U. HECKMANN:
Zur Resistenzbildung von Tumorzellen im Krebs-Chemotherapie-Resistenztest.
Krebsforschg. VI, 170 (1967)

18. LIMBURG, H. u. U. HECKMANN:
Chemotherapy in the Treatment of Advanced Pelvic Malignant Disease with Special Reference to Ovarian Cancer.
J.Obst.Gynec.Brit.Cwlth. 75, 1246-1255 (1968)

19. MEIER-RUGE, W., KALBERER, F. u. J. GRAUWILER:
Die Verteilung des antimitotisch wirksamen Äthylhydrazids der Podophyllinsäure (SP-I 77) im Organismus sowie in malignen Tumoren des Menschen.
Klin.Wschr. 42, 1024 (1964)

20. MOYED, H.S. u. M. FRIEDMAN:
Altered Feedback Control:
A Basis for Resistance to an Antimetabolite.
Fed.Proc. 18, 290 (1959)

21. NAKAHARA, O.: Critique of Carcinogenic Mechanism.
Fortschr.exp.Tumorforsch. 2, 194-197 (1961)

22. ODEBLAD, E.: Artefacts in Autoradiography.
Acta Radiologica Stockholm 39, 192-204 (1953)

23. POTTER, V.R.: The Molecular Basis of Neoplasia.
In 15th Annual Symposium on Fundamental Cancer Research.
Austin/Texas 367-399 (1962)

24. SIPUS, N., PADOVAN, I. u. M. LIPOCENCIC:
Submikroskopische Veränderungen der menschlichen Krebszellen unter Einwirkung von SP-I und SP-G (SANDOZ).
Oncologia 20, 276-290 (1966)

25. SITTE, H.: Morphometrische Untersuchungen an Zellen aus: Quantitative Methoden in der Morphologie. 167-198
E.R. Weibel, H. Elias
Springer Verlag Berlin (1967)

26. STÄHELIN, H. u. A. CERLETTI:
Experimentelle Ergebnisse mit den Podophyllum-Zytostatika SP-I und SP-G.
Schweiz.med.Wschr. 94, 1490-1502 (1964)

27. TIESLER, E.: Möglichkeiten bei der Resistenzentstehung von Mikroorganismen gegen Antibiotika.
Saarl.Ärzteblatt 3/69, 141-145 (1969)

28. UEHLEKE, H.: Zum Wirkungsmechanismus von Antibiotika und Chemotherapeutika. Landarzt 4/10, 408-412 (1966)

29. WELCH, A.D.: The Problem of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. Cancer Research 19, 359-371 (1959)

30. WELCH, A.D.: Einige Mechanismen und Probleme bei der selektiven Chemotherapie. Dtsch.med.Wschr. 36, 1956-1959 (1969)

31. WÜST, G.: Selektive Chemotherapie menschlicher Tumoren: Methoden und klinische Erfahrungen. Med.Welt 50, 3035-3042 (1967)

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. LIMBURG, Direktor der Universitäts-Frauenklinik Homburg, für die freundliche Überlassung des Themas und die Annahme der Arbeit herzlich bedanken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. U. HECKMANN bin ich für die verständnisvolle Einführung in das Arbeitsgebiet sehr verbunden.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn Oberarzt Dr. S. TRANEKJER, der die Durchsicht des Textes übernahm.

# L E B E N S L A U F

Am 5. Februar 1944 wurde ich als viertes Kind des Dr. ing. Hans Harms und seiner Frau Eva Harms, geb. Pawlowski, in Darmstadt geboren.

Ostern 1950 trat ich in die Volksschule Darmstadt-Arheiligen ein. Ab 1953 besuchte ich das humanistische Ludwig-Georgs-Gymnasium in Darmstadt, an dem ich 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Zum Sommersemester des gleichen Jahres immatrikulierte ich mich in der Medizinischen Fakultät der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt.

Dort bestand ich im Frühjahr 1964 die naturwissenschaftliche Vorprüfung.

Seit Sommersemester 1964 studierte ich an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes in Homburg.

Nach dem fünften Semester legte ich im Herbst 1965 die ärztliche Vorprüfung ab.

Das medizinische Staatsexamen bestand ich im Dezember 1968.

Seit dem 1. Januar 1969 arbeite ich als Medizinalassistent an der hiesigen Orthopädischen Universitätsklinik.

Homburg, den 3. Mai 1969